รายงานความก้าวหน้า โครงการวิจัย ABS

การผลิตเชื้อ *Bacillus* และการเตรียมสูตรสำเร็จ

1. การผลิตเชื้อ *Bacillus*

1.1 *Bacillus* NSRS -89-24

1.1.1 การเจริญในระดับขวดเขย่า ได้เปรียบเทียบสูตรอาหาร Molasses 5% + ($NH_4)_2$ HPO_4 1% โดยเติมและไม่เติมแร่ธาตุตามสูตร Mckeen ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 1 *Bacillus* NSRS -89-24 สามารถเจริญในอาหารทั้ง 2 ชนิดได้ดี โดยการเจริญในอาหารที่ไม่เติมแร่ธาตุจะดีกว่าเมื่อเติมแร่ธาตุเล็กน้อยมี OD_{660} สูงสุดเป็น 7.47 เมื่อเลี้ยงได้ 36 ชม.

สำหรับการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคข้าวพบว่าเมื่อ *Bacillus* NSRS -89-24 เจริญได้ 36 ชม.ในอาหารที่มีแร่ธาตุจะยับยั้ง *Rhizuctonia solani* ได้ 81.30 % แต่อาหารที่ไม่มีแร่ธาตุยับยั้งได้ 70.78 %และให้ผลยับยั้งการเจริญของ *Pyricularia grisea* ได้ เท่ากันเป็น 100 %

1.1.2 การเจริญในถังหมักขนาด 30 ลิตรได้ทดลองเลี้ยง *Bacillus* NSRS -89-24ให้มีปริมาตร 10 ลิตรในอาหาร ที่มี Molasses 5 % และมี ($NH_4)_2SO_4$ 1.0 % ให้อากาศ 1 VVM ที่อุณหภูมิ 35 ^{0}ซ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่า *Bacillus* NSRS 89-24 เจริญได้สูงสุดที่ 36 ชม.โดยมีค่า OD_{660} เป็น 9.50 และสามารถยับยั้ง *Rhizoctonia solani* ได้ 94.12% และยับยั้ง *Pyricolaria grisea* ได้ 88.66%

1.1.3 การเจริญในถังหมักขนาด 100 ลิตรใช้สูตรอาหารที่มี Molasses 10 % และสภาวะเริ่มต้นในการเลี้ยง ตาม 1.1.2 ผลการทดลองดังรูปที่ 3 พบว่าการเจริญสูงสุดมี OD_{660} เป็น 9.81 ที่เวลา 24 ชม. เมื่อตรวจเช็คการปนเปื้อนพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 48 ชม.ก็มีการปนเปื้อนโดยแบคทีเรียอื่น อย่างไรก็ตามเมื่อนำน้ำหมักที่อายุ 24 ชม.มาทดสอบการยับยั้ง *Rhizoctonia solani* ได้ 63 %และน้ำหมักที่มีอายุ48 ชม. ยับยั้งได้ 60 %

1.2 *Bacillus* MK 007

1.2.1 การเจริญในระดับขวดเขย่าผลการเลี้ยง Bacillus MK 007 ในอาหารที่มี molasses 2% และ soy bean meal

Soy bean meal(%)	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0
Count at 24 h (CFU/ml) X(10^9)		2.60	2.88	4.47	1.10	1.36

1.2.2 การเจริญในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้อาหารที่มี molasses และ ammonium dihydrogen phosphate 0.1 % และแร่ธาตุตามสูตรอาหาร Mckeen ได้ผลการทดลองดังนี้

%total sugar	1%	2%	3%
Count at maximum growth($X10^9$)	2.6(34h)		3.32(32h)
4.05(15h)			
Specific growth rate	0.842	0.988	0.804

1.2.3 การเจริญในถังหมักขนาด 100 ลิตร ใช้สูตร Molasses 3 % และ $(NH_4)_2HPO_4$ 0 .1% และแร่ธาตุอาหารตามสูตร Mckeen ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 ให้อากาศขั้นแรก 1 VVM อุณหภูมิ 35 ^{0}ซ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4 พบว่ามีการเจริญสูงสุดที่ 12 ชม. โดยมี OD_{660} เป็น 4.62 เมื่อตรวจเช็คการปนเปื้อนพบว่ามีการปนเปื้อนเกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 48 ชม.เช่นกัน เมื่อนำน้ำหมักมาทดสอบการยับยั้ง *Rhizoctonia solani* ได้สูงสุดเป็น 56 %(ที่ 18 ชม.)

2.การเตรียมสูตรเชื้อ

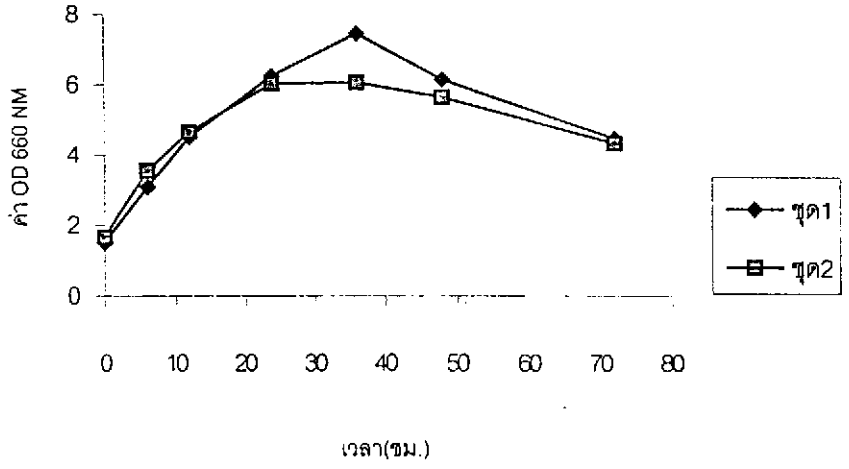
2.1 สูตรแห้งและสูตรน้ำ

ได้ทดสอบสูตรแห้งที่เตรียมโดยมี CMC 5%และ 10% (ของอาจารย์ขวัญจิต 1 และ 2) ในการเกาะติดใบเปรียบเทียบกับสูตรน้ำ (CMC 1%)โดยตรวจหาเชื้อที่เวลา 30 นาทีและ 7 วันหลังการฉีดต้นข้าวผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 พบว่าในสูตรแห้งความสามารถในการเกาะติดไม่แตกต่างกัน แต่ในสูตรน้ำที่มีการเติม CMC 5%มีการเกาะติดใบดีกว่าเมื่อใช้CMC 1 %

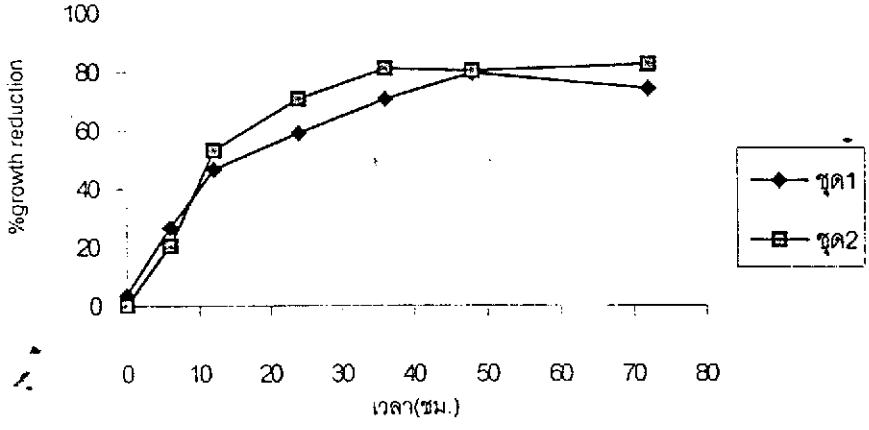
2.2 การเจริญของเชื้อจากสูตรแห้งและสูตรน้ำ

ได้ทดลองใช้สูตรแห้งและสูตรน้ำเจือจางโดยใช้ 1กรัม หรือ 1มล.ผสมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มล.แล้วดูด 0.1 มล.ใส่ในหลอดอาหารที่มี ซูโครส 2.0 %และ yeast extact 0.1 % ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 เชื้อจากสูตรแห้งมีการเจริญต่ำกว่าสูตรน้ำน่าจะมีผลมาจาก CMC โดย สูตรขวัญจิต 1 มี CMC 5 % ขวัญจิต 2 มี CMC 10 %ในขณะที่สูตรน้ำ 1 และ 2 มี CMC เพียง 1%

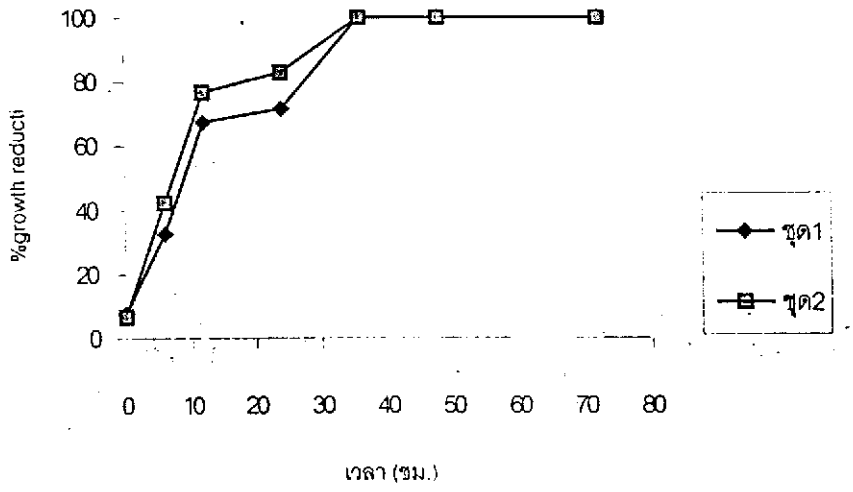
รูปที่ 1.1 การเจริญของเชื้อ*Bacillus* NSRS 89-24 ในอาหาร โมลาส+ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท(ชุด 1)เปรียบเทียบกับอาหาร โมลาส+ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟส+แร่ธาตุ(ชุด 2)

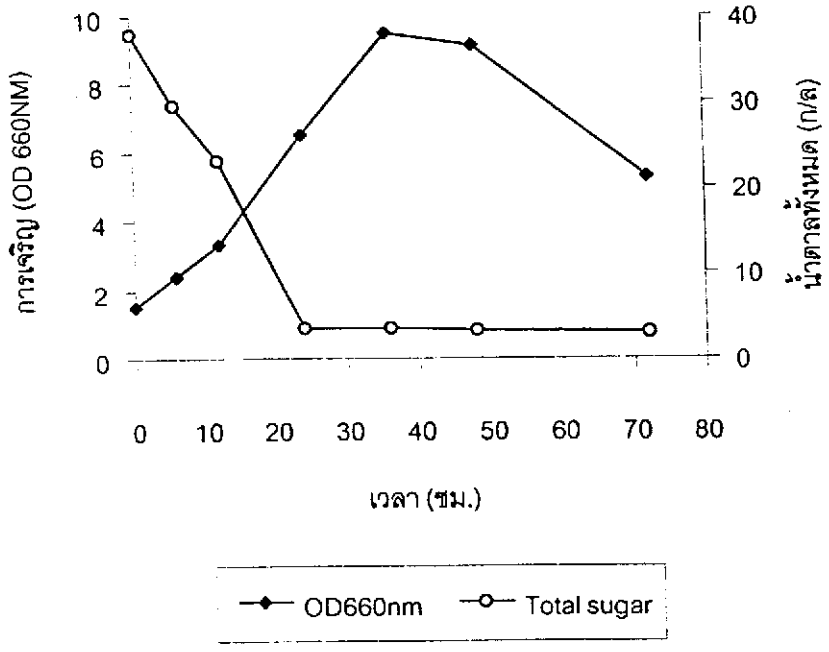


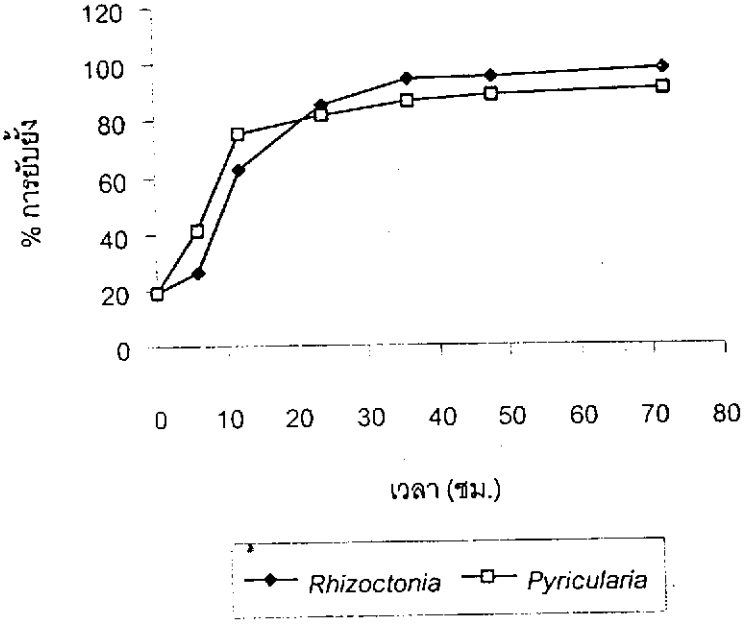
รูปที่ 1.2 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในอาหาร โมลาส+ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท(ชุด 1)เปรียบเทียบกับอาหาร โมลาส+ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟท+แร่ธาตุ(ชุด 2) ของเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24



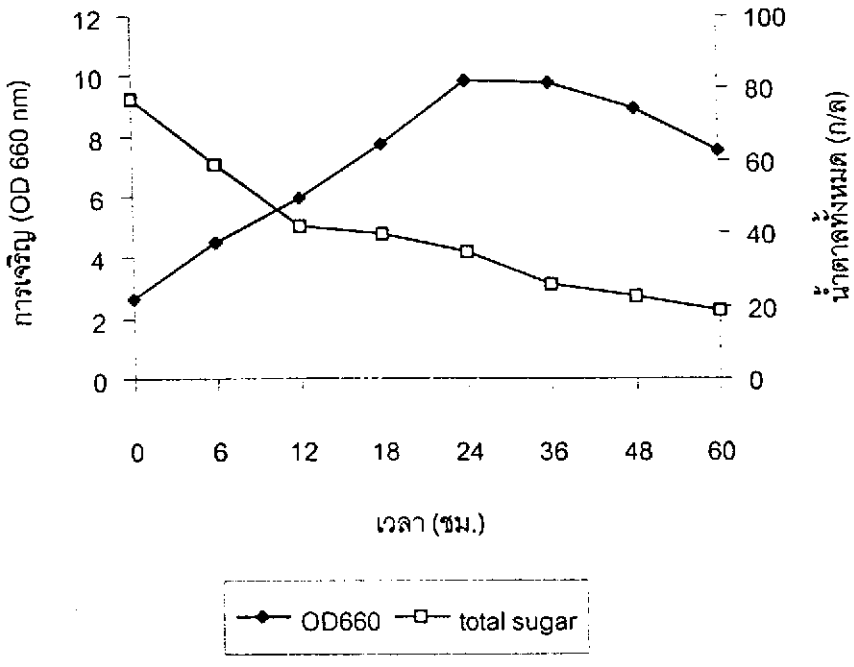
รูปที่ 1.3 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Pyricularia grisea* ในอาหาร โมลาส+ไดแอมโมเนีย มไฮโดรเจนฟอสเฟท(ชุด 1)เปรียบเทียบกับอาหาร โมลาส+ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟส+แร่ ธาตุ(ชุด 2) ของเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24

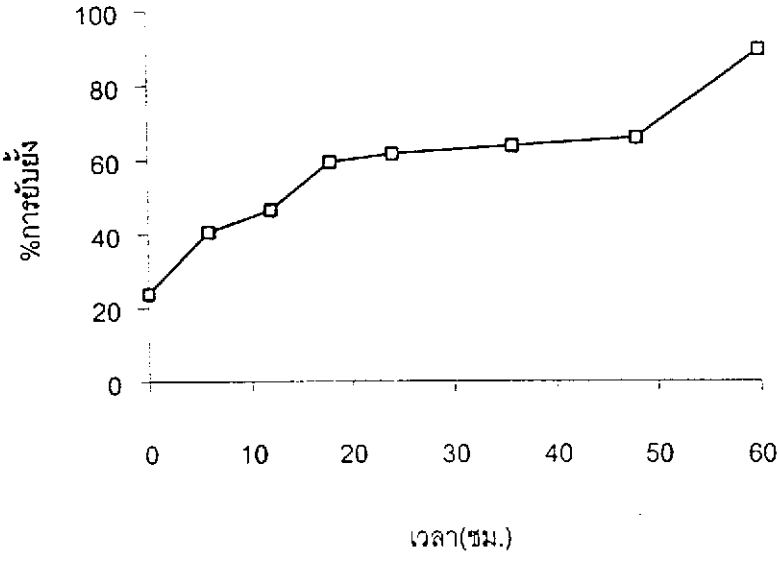




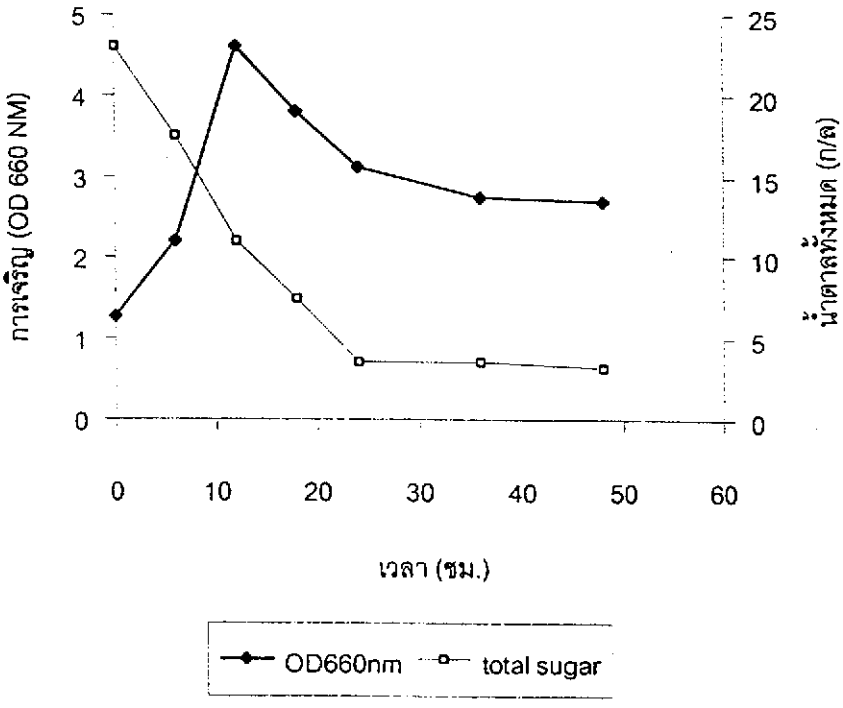


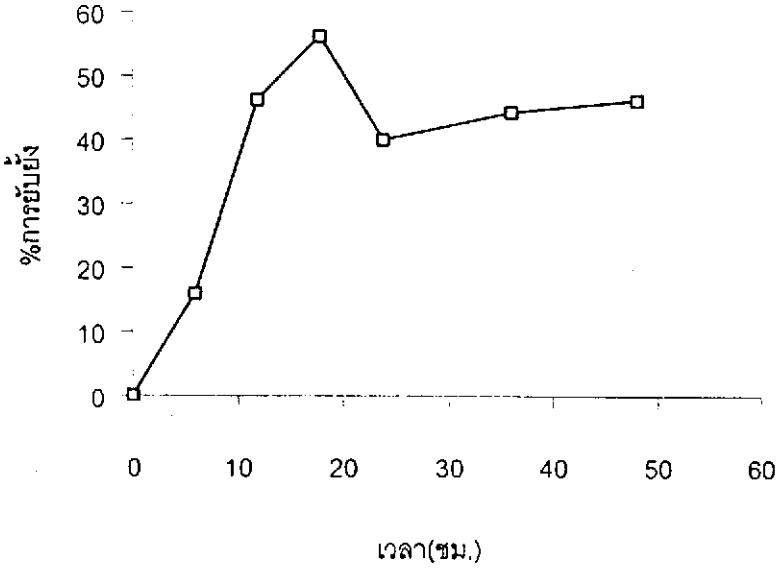
ภาพที่ 38 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด การเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ระหว่างการเจริญในถังหมักขนาด 10 ลิตร (อาหารประกอบด้วยโมลาส 5% และแอมโมเนียมซัลเฟต 1%)





ภาพที่ 39 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด การเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 ระหว่างการเจริญในถังหมักขนาด 100 ลิตร (อาหารประกอบด้วยโมลาส 10% และแอมโมเนียมซัลเฟต 1%)





ภาพที่ 40 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด การเจริญและการสร้างสารปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา ของ *Bacillus* MK007 ระหว่างการเจริญในถังหมักขนาด 100 ลิตร (อาหารประกอบด้วยโมลาส 3% และแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10% และแร่ธาตุตามสูตรอาหาร Mckeen)

วิธีการทดสอบฉีดต้นข้าว 17/1/41

สูตร 1. Bacillus (ขวัญจิต 1) ชั่ง 1 กรัมละลายน้ำ 100 มล.

สูตร 2. Bacillus (ขวัญจิต 2) ชั่ง 1 กรัมละลายน้ำ 100 มล.

สูตร 3. เซลล์เปียก Bacillus MK007 +น้ำกลั่น -CMC 1% 1 ml ละลายน้ำ 100 มล.

สูตร 4. เซลล์เปียก Bacillus MK007 +culture broth + CMC 1% 1 ml ละลายน้ำ 100 มล.

สูตร 5. เซลล์เปียก Bacillus MK007 -น้ำกลั่น -CMC 5% 1 ml ละลายน้ำ 100 มล.

สูตร 6. Bacillus MK 007 (ขวัญจิตร 1) ชั่ง 0.4 กรัมละลายน้ำ 100 มล.

สูตร 7.ชุดควบคุมไม่ฉีดเชื้อ

สูตรเชื้อ เจือจางน้ำ 100 มล.
↓
ใส่ขวด spray ฉีดน้ำ
↓
นำไปฉีดต้นข้าวในกระถาง 40 ฝอยประมาณ 18 มล.
↓
ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
↓
ตัดต้นข้าวใส่ถุง เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100 มล.
↓
เขย่าให้เข้ากันประมาณ 10 นาที (dilution 10^0)
↓
ทำ dilution ถึง 10^{-4}
↓

และนับเชื้อจากสูตรโดยตรง(เป็นตัว control) หลังจากนั้นหาน้ำหนักแห้งของต้นข้าว แล้วคำนวณหาเชื้อที่ติดต้นข้าว

ตารางที่ 1 ผลการนับเชื้อจากการฉีดต้นข้าวเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที และ 7 วัน (17/1/41)

สูตร	เชื้อก่อนการฉีดพ่น (CFU / ml)	หลังฉีด 30 นาที CFU/g	หลังฉีด 7 วัน CFU /g
1 (ขวัญจิต 1)	4×10^7	2.6×10^7	4.3×10^5
2 (ขวัญจิต 2)	3×10^7	2.0×10^7	9.3×10^5
3 สูตรน้ำกลั่น	2×10^7	8.0×10^6	2.3×10^5
4 สูตร culture broth	2×10^7	1.4×10^7	3.2×10^5
5 สูตรน้ำกลั่นCMC 5%	1×10^7	1.7×10^7	4.6×10^5
6 (ขวัญจิต 1) 0.4กรัม	1.4×10^7	1.2×10^7	2.5×10^5
7 ไม่ฉีดเชื้อ		ไม่พบเชื้อ	ไม่พบเชื้อ

16/1/41

การเจริญของสูตรเชื้อในอาหาร Yeast extract 0.1%+ Sucrose 2.0 %

1. สูตรแห้งขวัญจิต 1
2. สูตรแห้งขวัญจิต 2
3. สูตรน้ำ 1 *Bacillus* MK007
4. สูตรน้ำ 2 (รวม culture broth) *Bacillus* MK 007

เจือจางสูตร 1 กรัม หรือ 1 มล.ต่อน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 100 มล.แล้วดูดมา 0.1 มล.ใส่อาหาร 10 มล.

ตารางที่ 2 การเจริญของ *Bacillus* MK 007 จากสูตรต่าง ๆ ในอาหาร Yeast extract 0.1 % + Sucrose 2.0 %

เวลาที่เก็บตัวอย่าง (ชม.)	ค่า OD_{660}			
	ขวัญจิต 1	ขวัญจิต 2	สูตรน้ำ 1	สูตรน้ำ 2
0	0.00	0.00	0.00	0.00
24	0.80	0.70	0.90	0.95
48	0.60	0.60	1.00	1.10
72	0.60	0.55	1.10	1.30
96	0.60	0.55	1.70	1.70

การวัด MIC ของสูตรน้ำ 1 (96 ชม.)1/100 =38.46%

ของสูตรน้ำ 2 (96 ชม.)1/100 =51.28%

รายงานความก้าวหน้าการผลิตเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24 และ *Bacillus* MK 007

1. ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อในถังหมัก 100 ลิตร ที่มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา ซึ่งได้รายงานในการประชุมคราวที่แล้วแต่ไม่ได้เสนอข้อมูล จึงนำมาเสนอในครั้งนี้ (ตารางที่ 1 และ2)
2. การผลิต *Bacillus* NSRS 89-24 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร (working volume 20 ลิตร) เพื่อเตรียมเชื้อสำหรับการทดลองในแปลงนาใหญ่ ผลการทดลองดังตารางที่ 3 และรูปที่ 1.1 และ 1.2 มีน้ำหนักเซลล์เปียกประมาณ 189 กรัม/20 ลิตร

   เซลล์เปียก 1 กรัมมีเชื้อ 7.4×10^{10} CFU (หลังให้ความร้อน)

   ดังนั้นในการหมัก 1 ครั้งได้เชื้อ ประมาณ $189 \times 7.4 \times 10^{10} = 1.4 \times 10^{13}$ CFU

ข้อมูลจากคุณนงลักษณ์ สำหรับการทดลองแปลงนา 2 ไร่ เมื่อฉีดพ่น 3 ครั้งจะใช้สูตรเชื้อ 720 ลิตรต่อสูตร หากฉีดพ่นเชื้อ ประมาณ 10^7 CFU/มล.จะต้องใช้เชื้อทั้งหมด $720 \times 1000 \times 10^7 = 7.2 \times 10^{12}$ CFU/สูตร แสดงว่าการเตรียมสูตรเชื้อในถังหมัก 20 ลิตร ก็เพียงพอแล้วแสดงว่าการเลี้ยงเชื้อในถังหมัก 1 ครั้งก็เพียงพอต่อการเตรียมเชื้อ 1 สูตร จะทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24 สำหรับใช้ทั้งในสูตรแห้งและสูตรน้ำ สำหรับการทดลองในแปลงนา 3 ครั้ง (ต้องทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักอย่างน้อย 6 ครั้ง)

3. การผลิต *Bacillus* MK 007 ทางหัวหน้าโครงการได้ไปติดต่อกับ KMIT เพื่อขอใช้ถังหมัก1000 ลิตรเพื่อผลิตเชื้อ *Bacillus* MK 007 แต่ผลการทดลองคือเชื้อไม่เจริญและได้ให้ทางผมทดสอบว่าจะมีผลมาจากโมลาสที่ใช้และน้ำมันพืชหรือไม่ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2 สรุปได้ว่าโมลาสและน้ำมันพืชที่ใช้ทดลองไม่มีผลยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* MK007

   จากข้อมูลที่ได้รับเกี่ยวกับการใช้ถังหมัก1000 ลิตร ใช้โมลาสมี

reducing sugar	20	กรัม/ลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	10	กรัม/ลิตร
เติมน้ำมันพืช	1	ลิตร
ความเร็วรอบในการกวน	250	rpm
การให้อากาศ	1.5	VVM

สันนิษฐานว่าเนื่องเป็นการเลี้ยงในถังหมักขนาดใหญ่ ปัจจัยจำกัดการเจริญน่าจะมาจากการให้อากาศและการกวนเนื่องจากเป็นถังหมักขนาดใหญ่เมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ log phase dissolved oxygen คงจะหมดไป หรือไม่เช่นนั้นน่าจะเนื่องมาจากสภาวะที่เป็นกรดมากทำให้เชื้อเกิดการช็อคจึงไม่เจริญ

4. การผลิต *Bacillus* MK007 20 ลิตร working volume ผลดังแสดงในตารางที่ 5

5. แผนงานอนาคต

ทางมหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายายินดีให้ใช้ถังหมักขนาด 100 ลิตรฟรี 1 ครั้งคาดว่าคงจะไปทำการทดลองได้ในเดือนมิถุนายน โดยจะทดลองกับเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24 หากงบประมาณยังมีอยู่ก็จะทดลองกับ *Bacillus* MK 007 อีก 1 ครั้ง เพื่อหาข้อมูลเกี่ยวกับการผลิตในถังหมักขนาด 100 ลิตร

23/2/41 - 3/3/41

1. การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24 ในถังหมัก 100 ลิตร (90 ลิตร working volume) ที่ ม.มหิดล ศาลายา

1. เตรียม starter NB 7 ลิตร ในถังหมัก 10 ลิตร

2. สูตรอาหารใช้

โมลาส 10 %

แอมโนเนียมซัลเฟต 1 %

3. สภาวะที่เลี้ยง

ขณะเริ่มต้นให้อากาศ 1 VVM และความเร็ว 200 รอบ/นาที

อุณหภูมิ 35 ^{0}C

พีเอช 7

ควบคุม DO > 50 % สามารถทำได้

- โดยการเพิ่มความเร็วในการกวน ควรเพิ่มครั้ง 100 รอบ/นาที
- โดยการเพิ่มอากาศ

การป้องกันการเกิดฟอง

- โดยการเติม antifoam A 10% พร้อมอาหารในสูตร ตอนเริ่มต้น 10 มล.
- การฉีด antifoam ต้องปรับลดความดันให้เหลือประมาณ 0.1 bar โดยใช้กระบอกฉีดสเตอไรด์ (ใช้แล้วทิ้ง)

ตารางที่ 1. ผลการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24 ในถังหมัก 100 ลิตร ที่ ม.มหิดล ศาลายา

เวลาเก็บ ตย. (ชม.)	พีเอช	OD 660 NM	DO	total sugar g/l	% growth reduction
0	6.64	2.63	125.7	77	23.73
6	5.89	4.47	71.9	59	40.0
12	5.88	5.92	49.2	41.5	46.35
18	4.95	7.70	0	39.5	61.59
24	4.67	9.81	0	34.5	63.3
36	5.17	9.77	0	26	65.0
48	5.10	8.90	0	22.5	66.66

ผลการ streak เชื้อบนอาหาร PDA ของ starter 10 ลิตรจนถึงการเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เวลา 0 – 24 ชม. พบว่ามีเชื้อ *Bacillus* NSRS 89-24 เจริญเพียงอย่างเดียวแต่ที่เวลา 48 ชม. มีเชื้อปนเปื้อนและไม่พบ B-24 และเมื่อนำตัวอย่างที่เวลา 48 ชม. ไปผ่านความร้อนที่ 80^{0}ซ นาน 30 นาทีพบว่าไม่มีเชื้อเจริญเช่นเดียวกัน ลักษณะโคโลนีของเชื้อปนเปื้อน รูปร่างกลม สีครีมชุ่น มีเมือกเยิ้ม กลิ่นเปรี้ยว

และเมื่อนำเชื้อปนเปื้อนไปเลี้ยงในอาหาร NB 24 ชม. แล้วผ่านความร้อนที่ 60, 70, 80 และ 90°ซ นาน 20 นาทีพบว่าไม่มีเชื้อเจริญ

เนื่องจากตรวจไม่พบเชื้อปนเปื้อนที่เวลา 0 และ 24 ชม. ของการเพาะเลี้ยงแสดงว่ามีการปนเปื้อนในระหว่างการหมักคาดว่าน่าจะมาจากอากาศเข้าถัง

2. การเลี้ยง *Bacillus* MK 007 ในถังหมัก 100 ลิตร (Working volume) ที่ ม.มหิดลศาลายา

1. ลง starter NB 5 ลิตร เลี้ยง 16 ชม.
2. ใช้สูตร จากของอาจารย์เพ็ญแข สูตร/100ลิตร

โมลาส 3	%	
$NH_4H_2PO_4$	100.82	กรัม
KH_2PO_4	100	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	50	กรัม
KCl	100	กรัม
$MnSO_4H_2O$	0.04	กรัม
$CuSO_4.5H_2O$	0.16	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.12	กรัม

3. สภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับ *Bacillus* NSRS 89-24

ตารางที่ 2. ผลการเลี้ยง *Bacillus* MK 007 ในถังหมัก 100 ลิตร ที่ ม.มหิดล ศาลายา

เวลาเก็บ ตย. (ชม.)	พีเอช	OD 660	DO	total sugar g/l	% growth reduction
0	6.90	1.28	111.5	23	0
6	6.31	2.21	60.9	17.5	15.87
12	6.02	4.62	71.4	11.0	46.35
18	5.68	3.80	0	7.5	56.19
24	6.14	3.11	0	3.6	40.0
36	6.30	2.75	0	3.5	44.28
48	6.48	2.70	0	3.2	46.34

ผลการ streak เชื้อบนอาหาร PDA ของ starter 10 ลิตรจนถึงการเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เวลา 0 – 24 ชม. พบว่ามีเฉพาะเชื้อ *Bacillus* MK007 เจริญเพียงอย่างเดียวแต่ที่เวลา 48 ชม. มีเชื้อปนเปื้อนและพบ MK007 ด้วย และเมื่อนำตัวอย่างที่เวลา 48 ชม. ไปผ่านความร้อนที่ 80°ซ นาน 30 นาที พบว่า MK 007 เจริญอย่างเดียว ลักษณะโคโลนีของเชื้อปนเปื้อน รูปร่างกลม สีขาวใส และเมื่อนำเชื้อปนเปื้อนไปเลี้ยงในอาหาร NB 24ชม. แล้วผ่านความร้อนที่ 60, 70, 80 และ 90°ซ นาน 20 นาที พบว่าไม่มีเชื้อเจริญ

16/4/41

3. การเลี้ยง Bacillus NSRS 89-24 ในถังหมัก 20 ลิตร (working volume)

เลี้ยงเชื้อ Bacillus NSRS 89-24 โดยใช้สูตรอาหาร Molasses 5%+$(NH_4)_2SO_4$ 1% ให้อากาศ 1 VVM ความเร็วในการกวน 200 rpm อุณหภูมิ 35^0ซ พีเอชเริ่มต้น 7 เลี้ยง 72 ชม.

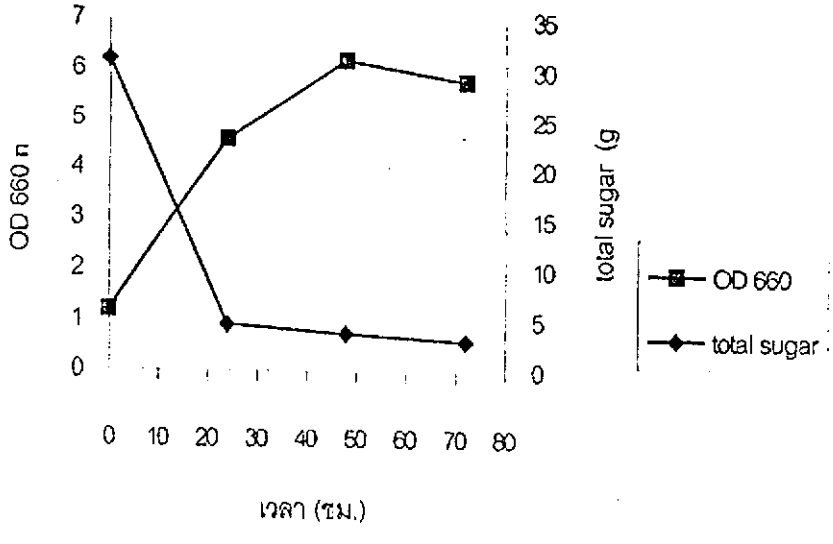
ตารางที่ 3. ผลการเลี้ยง Bacillus NSRS 89-24 ในถังหมัก 20 ลิตร (working volume)

เวลา (ชม.)	OD_{660}	pH	total sugar	เชื้อก่อนให้ความร้อน	เชื้อหลังให้ความร้อน	%growth reduction	cell dry weight g/l
0	1.2	7.0	31.0	-	-	13.2	
24	4.6	6.3	4.6	$5.0x10^8$	3.8x106	76.27	
48	6.2	6.0	3.7	$7.8x10^8$	6.0x108	88.12	
72	5.8	5.9	3.0	$7.0x10^8$	6.3x108	94.06	

น้ำหนักเซลล์เปียก 189.83 กรัมต่อ 20 ลิตร

น้ำหนักเซลล์เปียก 1 กรัมมีเชื่ออยู่เท่ากับ $7.4 x10^{10}$ CFU (หลังจากให้ความร้อน)

รูปที่ 1.1 การเจริญของเชื้อ Bacillus NSRS 89-24 ในถังหมัก 20 ลิตร โดยใช้สูตร Molasses 5%+ แอมโมเนียมซัลเฟต 1% ให้อากาศ 1 VVM pH 7 ความเร็วในการกวน 200 rpm อุณหภูมิ 35^0ซ



5/5/41

การเลี้ยง *Bacillus* MK 007 ใน Shaker โดยใช้สูตรอาหาร

1. Molasses 5 % + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% (ใช้โมลาสของอาจารย์วิจิตรา)
2. Molasses 5 % + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% + น้ำมันพืช 1.0%

ตารางที่ 4.1 ผลการทดลองเลี้ยง *Bacillus* MK007 โดยใช้สูตรอาหาร Molasses 5% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%

เวลา (ชม.)	พีเอช	OD660	total sugar g/l	เชื้อก่อนให้ความร้อน CFU/ml	เชื้อหลังให้ความร้อน CFU/ml	%growth reduction
0	6.99	1.50	32			11.10
24	6.63	7.58	15.5	$1.9x10^9$	$1.6x10^9$	79.01
48	6.49	11.37	5.1	$6.0x10^9$	$5.0x10^9$	86.96

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดลองเลี้ยง *Bacillus* MK 007 โดยใช้สูตรอาหาร Molasses 5% + $(NK_4)_2SO_4$ 0.1% + น้ำมันพืช 1.0%

เวลา (ชม.)	พีเอช	OD660	total sugar g/l	เชื้อก่อนให้ความร้อน CFU/ml	เชื้อหลังให้ความร้อน CFU/ml	%growth reduction
0	7.0	1.71	33			13.79
24	6.64	11.96	17.5	$2.2x10^9$	$2.2x10^9$	82.63
48	6.52	15.98	6.1	$2.0x10^{10}$	$2.0x10^{10}$	90.66

ผลการทดลองแสดงว่าปัญหาที่อาจารย์วิจิตราไปใช้ถังหมัก 1000 ลิตรที่ KMIT และเชื้อ *Bacillus* MK 007 ไม่เจริญไม่ได้มีสาเหตุมาจากน้ำตาลโมลาสและการเติมน้ำมันพืชเพื่อเป็นสารกำจัดฟองก็ไม่ได้มีผลยับยั้งการเจริญถึง 10% ก็ไม่ได้มีผลยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* MK007